

EXPERIMENTO 5

ENZIMA CATALAZA

**ACTIVIDAD ENZIMATICA. FACTORES QUE LA AFECTAN.
DETERMINACION DE LA CONSTANTE DE
MICHAELIS-MENTEN. EFECTO DE INHIBIDORES SOBRE LA
ACTIVIDAD ENZIMATICA.**

REQUISITOS

Repasar la deducción de la fórmula de Michaelis-Menten, sus premisas y aplicación. Balance de ecuaciones y titulación

OBJETIVOS

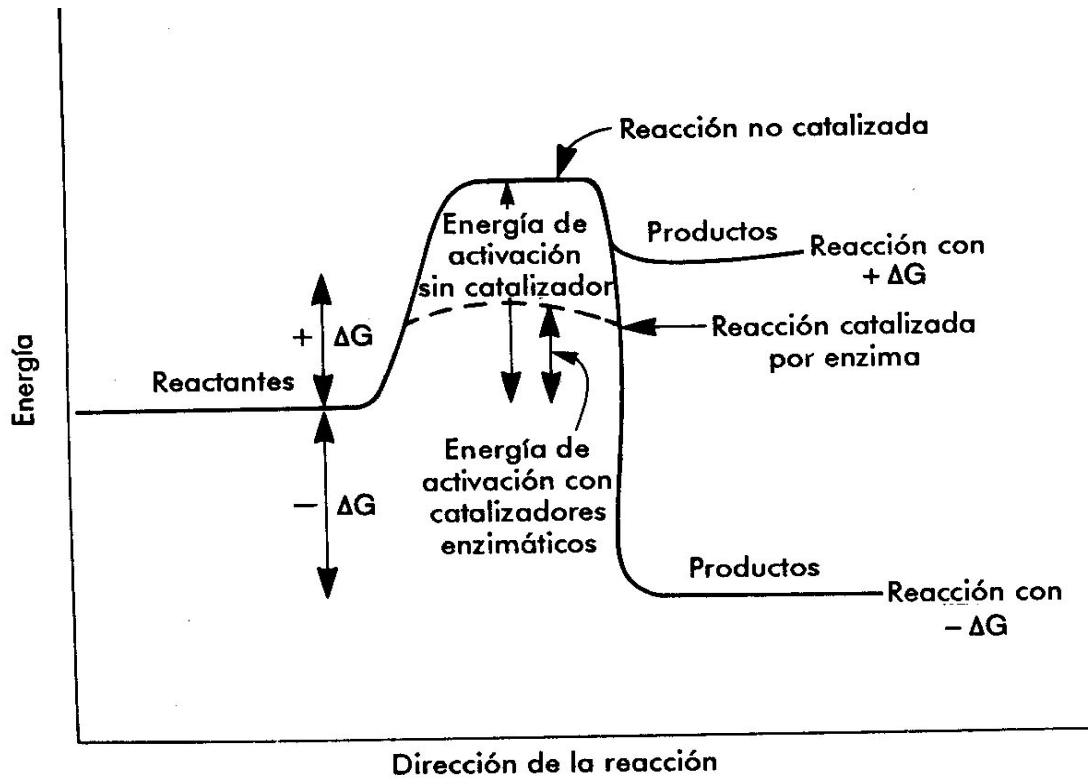
Describir algunas características de las enzimas.
Determinar la actividad enzimática de las catalasas, su K_m y el efecto de inhibidores sobre la actividad enzimática

1. FUNDAMENTOS

Las enzimas son catalizadores biológicos de naturaleza proteica. Esto significa que son proteínas cuya función es acelerar las reacciones bioquímicas. Aunque se trata de proteínas muchas requieren, para ser activas, un componente no proteico conocido como coenzima o grupo prostético, según se encuentre débil o firmemente asociado a la matriz proteica. La estructura de este componente no proteico va a variar desde un ion (Ca^{++} , Mg^{++} , Mn^{++} , y otros) hasta moléculas complejas como NAD^+ , $NADP^+$ y FAD. En estos casos la actividad enzimática va a depender de la presencia simultánea de una porción proteica (apoenzima) y una porción no proteica (coenzima) y el conjunto activo apoenzima mas coenzima, se conoce como holoenzima.

La actividad enzimática se estudia en el equilibrio, donde no hay cambio neto en la cantidad de sustrato o de producto. En los sistemas biológicos, las enzimas abaten la energía de activación y permiten que se produzcan reacciones, que de otro modo, no ocurrirían a velocidades medibles. Las enzimas no se consumen en el proceso y las reacciones catalizadas no alteran la naturaleza de la reacción, solo disminuyen la energía de activación. (Figura 1)

Figura 1 Diagrama de energía para reacciones con ΔG positiva y negativa comparando una reacción catalizada contra una no catalizada.



Una consecuencia del hecho de que las reacciones bioquímicas sean catalizadas por enzimas es la especificidad de éstas hacia el sustrato: una enzima cataliza la transformación de un solo tipo de molécula o de unos tipos diferentes de moléculas estructuralmente muy relacionadas, la especificidad representa una ventaja para la célula.

Las enzimas dependiendo de las reacciones que catalizan, se han clasificado por la comisión internacional de enzimas (E.C) en cuatro dígitos que anteceden al nombre recomendado para la enzima, este nombre está compuesto por uno corto unido al nombre de la reacción que cataliza, los dígitos son: el primero se refiere a la clase y van del 1 al 6, representan la reacción general catalizada, el segundo la sub-clase, el tercero la sub-subclase y el cuarto designa a cada enzima específica. En la tabla a continuación se muestra la clasificación solamente del primer dígito:

Tabla 1. Clasificación de las enzimas en su primer dígito.

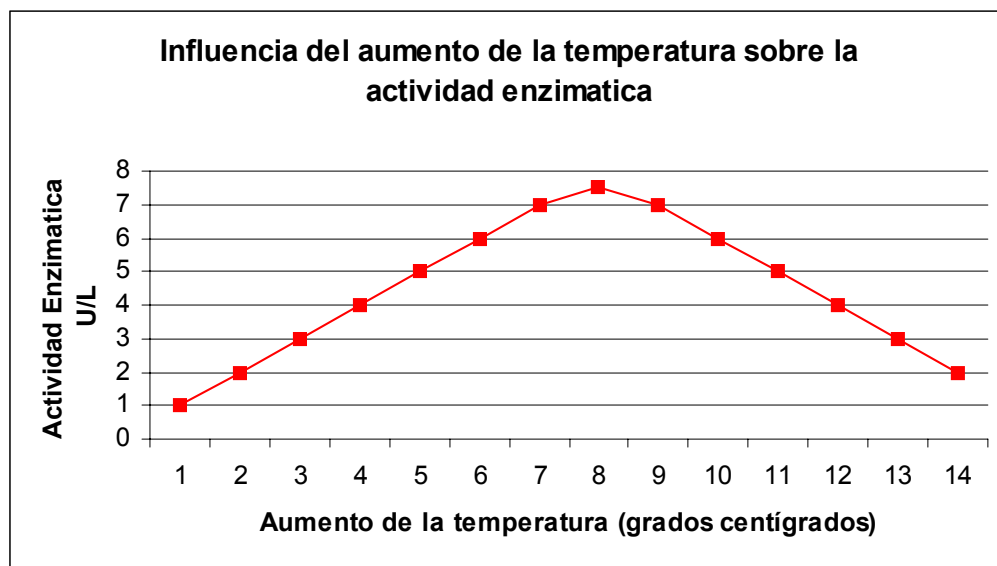
Clasificación	Tipo de reacción	Ejemplo
Oxidorreductasa	$A \text{ oxidada} + B \text{ reducida} \rightleftharpoons A \text{ reducida} + B \text{ oxidada}$	<p>Alcohol deshidrogenasa</p> $R-OH + NAD^+ \rightleftharpoons R=O + NADH + H^+$
Transferasa	$A-X + B \rightleftharpoons A + B-X$	<p>Hexocinasa</p> $ATP + \text{glucosa} \rightarrow \text{glucosa 6-fosfato} + ADP$
Hidrolasa	$A-B + H_2O \rightleftharpoons A + B$	<p>Lactasa</p> $\text{lactosa} + H_2O \rightarrow \text{glucosa} + \text{galactosa}$
Liasa	$\begin{array}{c} -C-C- \\ \quad \\ A \quad B \end{array} \rightleftharpoons C=C + A-B$	<p>Aldolasa</p> $\text{fructosa 1,6-difosfato} \rightleftharpoons \text{fosfato de dihidroxiacetona} + \text{gliceraldehído 3-fosfato}$
Isomerasa	$\begin{array}{c} A \\ \\ -C=C- \\ \\ B \end{array} \rightleftharpoons \begin{array}{c} -C=C- \\ \quad \\ A \quad B \end{array}$	<p>Trans-enol CoA-isomerasa</p> $\begin{array}{c} R-CH=CH-CH_2-C(=O)-CoA \\ \updownarrow \\ R-CH_2-CH=CH-C(=O)-CoA \end{array}$
Ligasa	$ATP + A + B \rightleftharpoons A-B + ADP + P_i$	<p>DNA ligasa</p> $\begin{array}{c} X \quad Y \\ \quad \\ ATP + \text{---}OH \quad P \text{---} \\ \downarrow \quad \downarrow \\ AMP + PP_i + \text{---}P \text{---} \\ \quad \\ X \quad Y \end{array}$

Como proteínas que son, las enzimas, son moléculas de uso delicado por ser fácilmente desnaturalizables. Debido a esto, deben manipularse bajo condiciones que no favorezcan la desnaturalización puesto que ésta conduce a la inactivación. Entre las condiciones que se deben controlar durante la manipulación de las enzimas, cabe destacar:

1.1 Condiciones a controlar durante la manipulación de las enzimas:

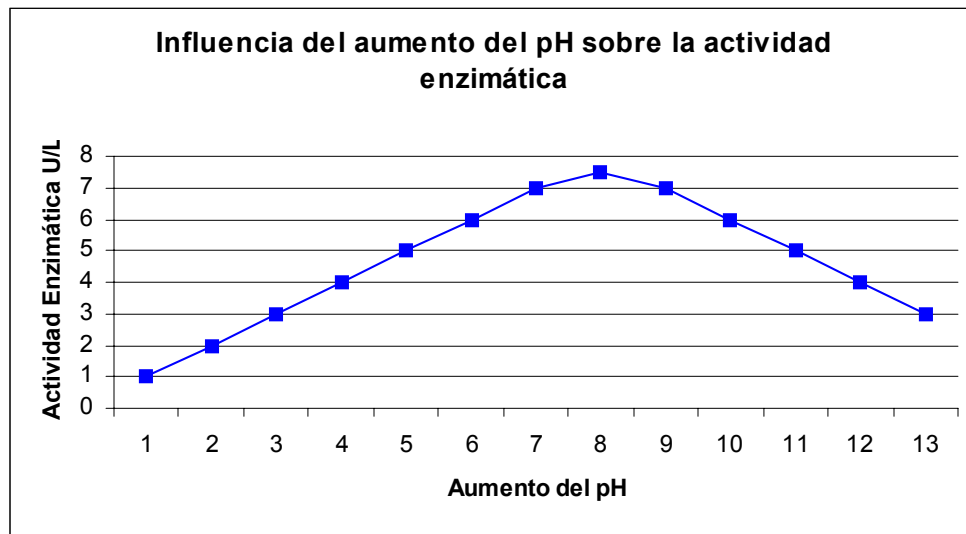
La temperatura: La estructura terciaria de una proteína es muy sensible a los cambios de la temperatura ya que, como sabemos, se mantiene gracias a fuerzas no covalentes altamente sensibles al calor. Esto hace que la actividad enzimática muestre una dependencia de la temperatura como la representamos en la figura. 2.

Figura. 2 Influencia del aumento de la temperatura sobre la actividad enzimática



1.1.1. El pH: Debido a que los cambios de pH modifican las concentraciones de los iones H^+ y OH^- de la solución, las interacciones electrostáticas intra e intermoleculares así como las interacciones entre las moléculas de proteínas y la solución de un valor de pH a otro, modificándose así también la estructura tridimensional y la actividad de la proteína. La gráfica que se obtiene cuando se estudia la actividad enzimática en función del pH se parece a la obtenida en el párrafo anterior como se puede notar en la siguiente figura.

Figura. 3. Influencia del aumento del pH sobre la actividad enzimática



1.1.2. La fuerza iónica: Como la fuerza iónica esta relacionada con la concentración de los diferentes iones de una solución y éstos pueden influir sobre la estabilidad y la actividad de una proteína debe mantenerse un control sobre este parámetro.

1.1.3. La agitación: Las soluciones de proteínas tienen baja tensión superficial, lo cual determina que cuando estas soluciones se agitan violentamente, se forma espuma. la formación de espuma es un factor que favorece la desnaturalización.

1.2. Determinación de la actividad enzimática

Cuando en el laboratorio se desea estudiar la actividad de una enzima particular, se comienza por controlar algunos parámetros que van a determinar la reproducibilidad de los ensayos. Entre estos parámetros se pueden destacar:

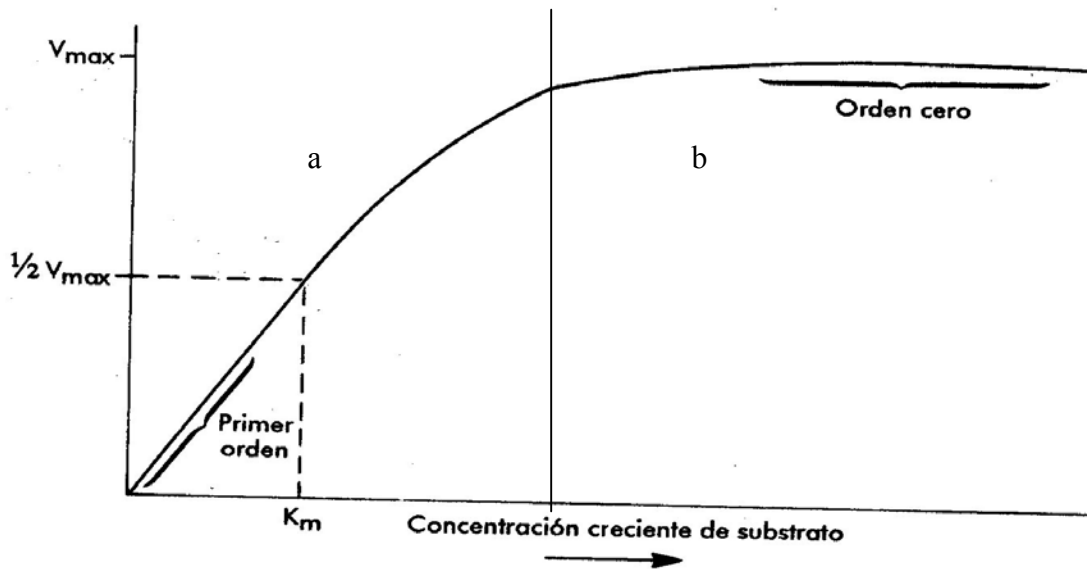
1.2.1. Métodos de detección: Lo primero de que se debe disponer es de un método que permita detectar y cuantificar el producto formado o el sustrato remanente después de la reacción. Los métodos más usados por su rapidez y sencillez, son los colorimétricos y espectrofotométricos; luego se encuentran la cromatografía en papel, en capa fina o de gases; titulación, respirometría, otros.

1.2.2. Tiempo de incubación: Para determinar una actividad enzimática es necesario fijar un intervalo de tiempo conveniente durante el cual se consuma una cantidad mensurable de sustrato. Debe siempre garantizarse que haya un exceso de sustrato. Para determinar el tiempo de incubación, se mezclan los reactantes en varios recipientes y se detiene la reacción a diferentes tiempos.

Se consigue que mientras no ha ocurrido la saturación de la enzima por el sustrato, la actividad es proporcional al tiempo de incubación; la saturación provoca la pérdida de la proporcionalidad; sin

embargo, no se debe confundir la situación en que se alcanza la saturación con la situación en que se ha agotado el sustrato; por esto el sustrato debe estar en exceso. La gráfica que debe encontrarse es la que se muestra en la figura 4.

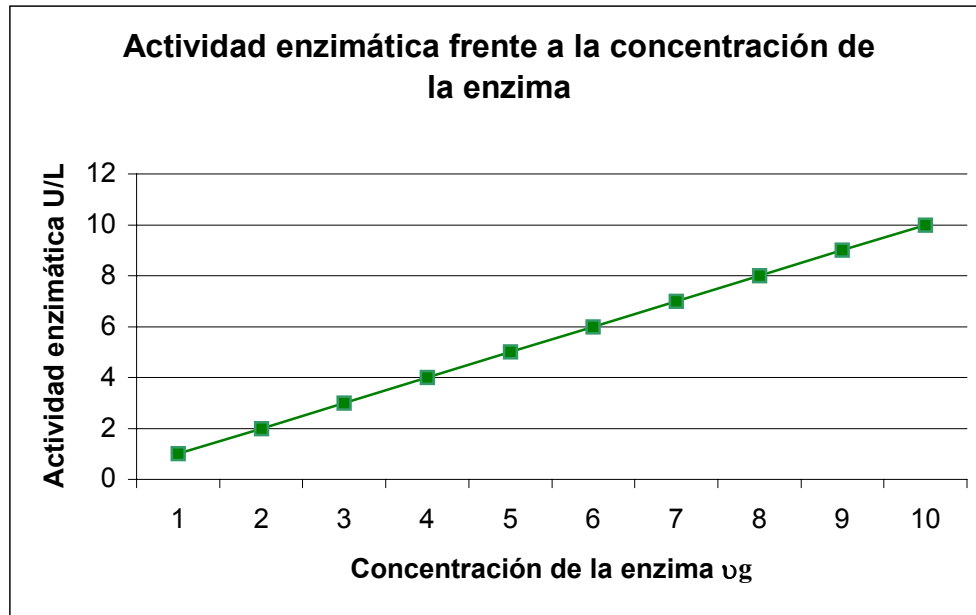
Figura 4. Velocidad de reacción frente concentración del sustrato (V vs. [S])



Para estudiar la reacción, se puede elegir cualquier lapso comprendido dentro de la barra a y se debe desechar el lapso representado por b, el tiempo debe ser tal que se pueda hacer una determinación confiable de la actividad.

1.2.3. Concentración de la enzima: Determinado el tiempo de incubación y en la seguridad de que la concentración de sustrato es excesiva se incuban las mezclas de reacción durante el tiempo predeterminado pero con cantidades diferentes de enzimas; si el sustrato se encuentra en exceso, se debe hallar una proporcionalidad directa entre la actividad y la concentración de enzima (Figura.5).

Figura 5 Actividad enzimática frente a la concentración de la enzima



Se debe elegir una cantidad de enzima que permita una determinación confiable de la actividad.

1.2.4. Concentración del sustrato: La determinación de este parámetro es muy importante por dos razones principales:

- Permite el cálculo de las propiedades cinéticas K_m y V_{max} para ese sustrato.
- Indica definitivamente qué concentración de sustrato se puede considerar saturante.

Por lo general, se considera saturante y se emplea rutinariamente una concentración de sustrato $[s] = 10 K_m$. Diga el estudiante a qué fracción de V_{max} corresponde la actividad enzimática cuando $[s] = 10 K_m$. Como ya el estudiante debe imaginarse, esta determinación se realiza empleando una cantidad fija de enzima e incubando durante un mismo lapso de tiempo pero con diferentes concentraciones de sustrato. Al hacer esto hay que tomar en ciertas precauciones prácticas: Debe cuidarse con las concentraciones inferiores que no se agote el sustrato en el lapso de tiempo fijado con la cantidad de enzima usada. Para evitar esto hay varias alternativas: aquí las mencionaremos y el estudiante deberá averiguar como se justifican:

- No hacer ninguna modificación al tiempo ni a la cantidad de enzima determinados.
- Reducir la cantidad de enzima e incubar durante el tiempo determinado.
- Reducir el tiempo de incubación y mantener fija la cantidad de enzima determinada.

- d. Reducir el tiempo de incubación y la cantidad de enzima.
- e. No emplear concentraciones de sustrato demasiado bajas.

1.2.5. Temperatura de incubación: Sabemos que la velocidad de una reacción química aumenta al elevarse la temperatura; esto también es cierto para las reacciones enzimáticas pero el rango de activación por la temperatura es limitado, generalmente 0°C y 45°C; aunque estas cifras no son absolutas, por lo general a menos de 0°C la actividad es prácticamente indetectable mientras que a más de 45°C la enzima se inactiva, por las razones expuestas previamente. La temperatura óptima de reacción se determina incubando bajo condiciones constantes de los parámetros previamente determinados y a temperaturas diferentes; la gráfica es la mostrada en la Figura 2.

1.2.6. pH de incubación: Se procede igual que para determinar la temperatura óptima pero sólo se varía el pH de la mezcla de reacción; la gráfica que se obtiene es la mostrada en la Figura 2.

1.3. La determinación de la constante de Michaelis y el efecto de inhibidores sobre la actividad enzimática

Partiendo de la hipótesis de la formación del complejo enzima sustrato de que la velocidad de descomposición del sustrato es proporcional a la concentración del complejo intermediario ES, Michaelis y Menten derivaron una ecuación que indica como varía la velocidad de reacción en función de la concentración de sustrato.

Esta ecuación tiene la expresión:



$$v = \frac{V_{\max} \cdot [S]}{K_m + [S]} \quad \text{o} \quad v = \frac{V_{\max}}{\frac{K_m + 1}{[S]}}$$

$$K_m = [S] \left(\frac{V_{\max}}{v} - 1 \right)$$

La constante de Michaelis es un parámetro de gran importancia y al mismo tiempo una característica de cada enzima con un valor constante sólo para condiciones definidas del sistema. Si una enzima actúa para varios sustratos tendrá un K_M para cada sustrato.

La constante de Michaelis puede definirse como la concentración del sustrato a la semi velocidad máxima de reacción; tiene por consiguiente las dimensiones de una concentración de sustrato en mol/L.

Esta definición proviene de la fórmula de K_m puesto que cuando $v = \frac{V_{\max.}}{2}$

entonces $K_m = [S]$.

1.3.1 Métodos para determinar la constante Michaelis-Menten.

1. Si la velocidad inicial de la reacción se gráfica como función de las concentraciones del sustrato se puede determinar la velocidad máxima y también la concentración del sustrato a la semi-velocidad máxima de reacción (K_m).

2. Un procedimiento o método más empleado es el de Lineweaver y Burk el cual consiste en graficar los recíprocos de las velocidades de reacción contra los recíprocos de las concentraciones del sustrato con lo cual se obtiene una línea recta.

Tomando la inversa de la ecuación $v = \frac{V_{\max.} [S]}{K_m + [S]}$

Se obtiene
$$\frac{1}{v} = \frac{K_m + [S]}{V_{\max.} [S]}$$

$$\frac{1}{v} = \frac{K_m}{V_{\max.} [S]} + \frac{[S]}{V_{\max.} [S]}$$

$$\frac{1}{v} = \frac{1}{V_{\max.}} + \frac{K_m}{V_{\max.}} \left[\frac{1}{[S]} \right] \quad (1)$$

Esta es la ecuación de una recta ($y = a + b x$) cuyo coeficiente angular es $K_m / V_{\max.}$ y el valor de la ordenada en el origen es $1 / V_{\max.}$ en el eje $1/v$.

Cuando $1/v = 0$, entonces
$$\frac{-1}{K_m} = \frac{1}{[S]}$$

De este modo es posible obtener gráficamente los valores de $V_{\max.}$ (en la intersección de $1/v$) y calcular el valor de K_m . La siguiente figura representa

1.3.2 Inhibición de la actividad enzimática.

Algunas sustancias actúan sobre las enzimas o coenzimas que intervienen en una reacción enzimática afectando la V_{\max} de reacción y/o la afinidad de la enzima por el sustrato. El uso de estas sustancias inhibidoras ha permitido conocer la naturaleza de grupos funcionales del centro activo, la especificidad del sustrato, posibles mecanismos de reacción enzimáticos y la participación de algunos grupos funcionales en el mantenimiento de la conformación de la enzima específica para su actividad biológica.

La inhibición puede ser: reversible o irreversible. En el primer caso es posible eliminar el inhibidor por diálisis recuperar la enzima intacta. En el segundo caso el inhibidor reacciona con la enzima destruyendo uno ó más grupos funcionales de la enzima y no puede eliminarse dicho inhibidor por diálisis. En exceso de inhibidor su acción aumenta con el tiempo ya que la formación del complejo EI es irreversible.

Inhibición reversible: Específica. El inhibidor se combina con el centro activo de la enzima D con grupos funcionales esenciales para la actividad enzimática pero que no están en el centro activo. Este tipo de inhibición puede ser: Competitivo o no competitivo.

Inhibición competitiva: La enzima puede enlazar en su centro activo una sustancia estructuralmente relacionada a su verdadero sustrato previniéndose de esta manera la unión al sustrato; el S y el I compiten por alcanzar el centro activo de la enzima; esta inhibición se revierte por exceso de sustrato. El valor de la K_m cambia pero no V_{\max} alcanzada en la reacción sin inhibidor.

Inhibición no competitiva: Ocurre cuando se produce inhibición específica y reversible que depende sólo de la concentración del inhibidor y no se elimina por aumento de la concentración del sustrato. Esto indica que el I se une a E en un punto esencial para la actividad enzimática diferente del centro activo. Con el inhibidor no competitivo la K_m permanece invariable pero V_{\max} alcanzada es menor que la que se logra en ausencia de inhibidor.

1.3.3 Métodos para determinar el efecto de inhibidores: Las figuras a continuación (6, 7 y 8), muestran el efecto de los diferentes tipos de inhibición por los métodos de Michaelis-Menten y Lineaweaver-Burk

Figura 6 Inhibidor competitivo (K_m alterada y la V_{max} es igual). Por los métodos de Michaelis-Menten y Lineaweaver-Burk

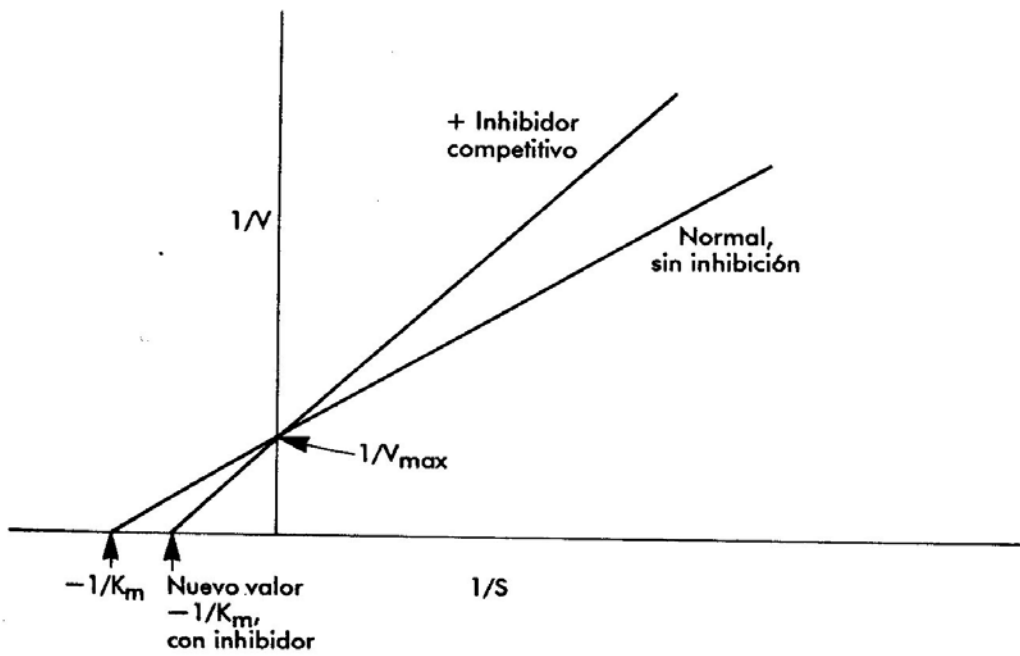
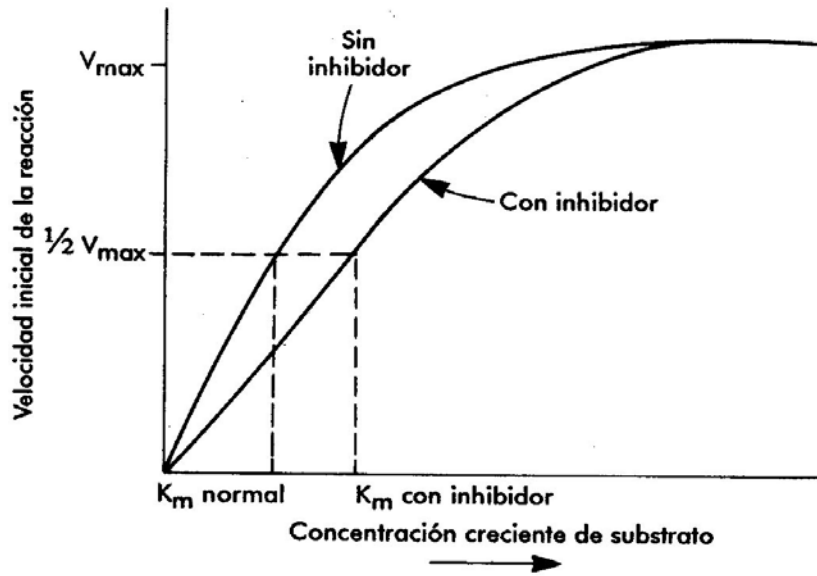


Figura 7 Inhibidor no competitivo (K_m inalterada y V_{max} menor en ausencia de inhibidor).
Por los métodos de Michaelis-Menten y Lineaweaver-Burk

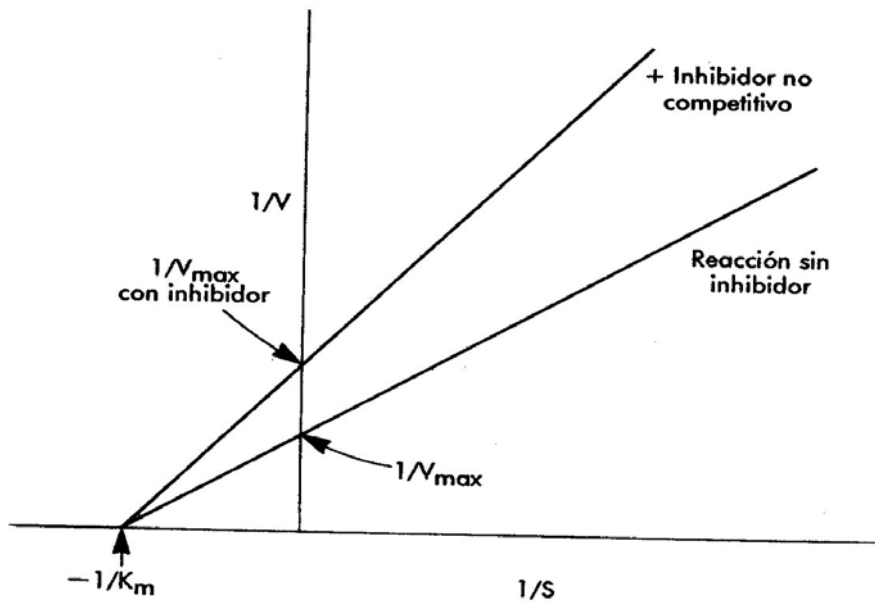
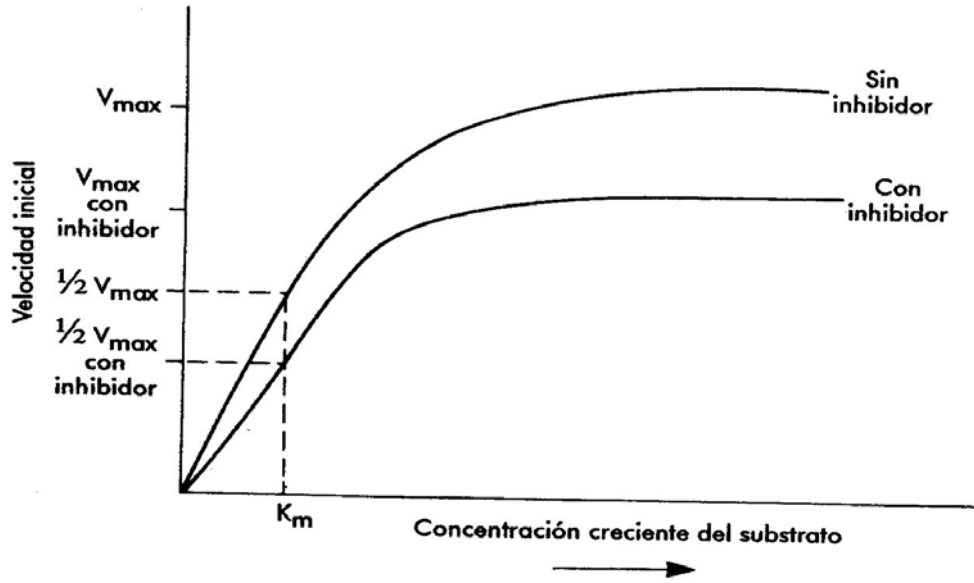
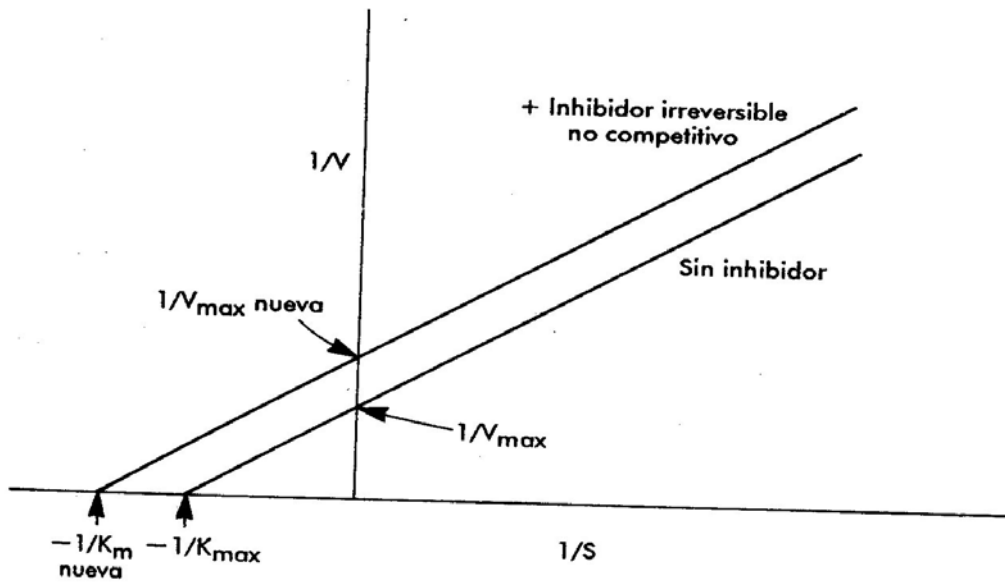
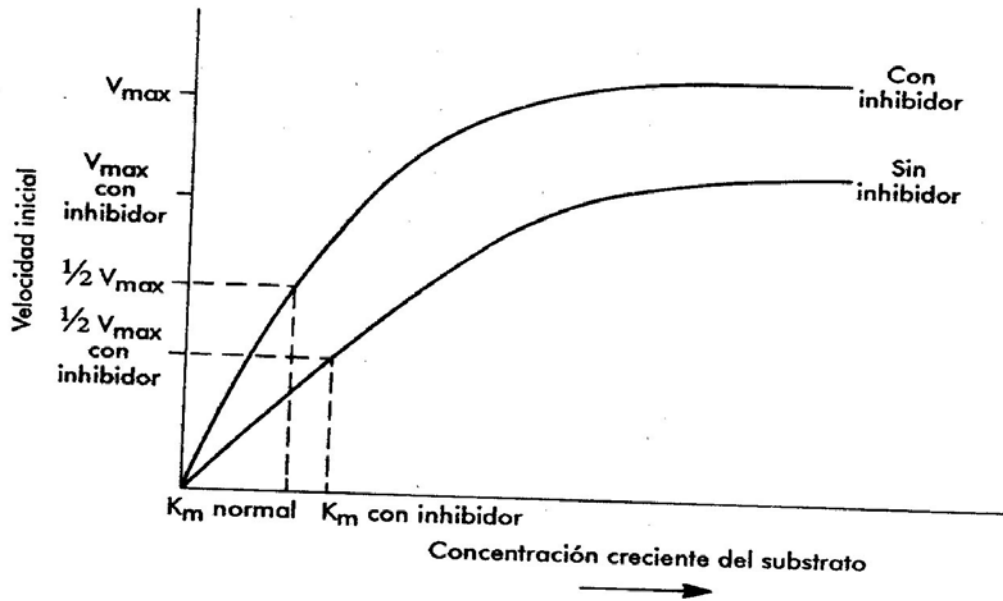


Figura 8 Inhibidor irreversible no competitivo (K_m y V_{max} menor en ausencia de inhibidor).
 Por los métodos de Michaelis-Menten y Lineaweaver-Burk



2. MATERIALES EQUIPOS Y REACTIVOS:

Soportes Universales	Embudos
Pinzas	Cronómetro (aportados por los alumnos)
Nueces	Ácido sulfúrico 2N
Buretas de 50 ml	Permanganato de potasio 0,1N
Pipetas de 125 y 10 ml	Papel milimetrado (aportado por los alumnos)
Fiolas de 125 ml	Soluciones tampón a diferentes pH
Agua oxigenada (H ₂ O ₂)	

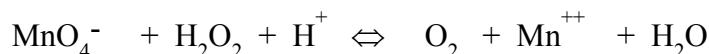
2.1 Procedimiento:

2.2.1. Preparación de la enzima:

A un litro de agua destilada enfriada en hielo agregue 1 ml de sangre obtenida por venipuntura y mezcle volteando suavemente el recipiente dos veces. Esta solución se mantiene siempre en hielo. Puede usarse 1 ml de homogeneizado de hígado o riñón de res o ratas.

2.2.2. Detección de la actividad enzimática: Se detectará la actividad enzimática de la catalasa titulando con permanganato de potasio 0 1N el agua oxigenada presente en cada fiola, después de agregársele ácido sulfúrico 2N.

La ecuación en que se basa el método de detección es:



El estudiante debe balancear la ecuación y analizarla ya que a partir de ella se realizarán los cálculos que se van a necesitar durante la práctica. Igualmente el alumno deberá repasar lo aprendido en química inorgánica sobre titulación.

2.2.3 Determinación del volumen de enzima:

a. Numere 10 fiolas y siga el esquema de trabajo mostrado a continuación:

Fiola N°	H ₂ O ₂ (ml)	H ₂ O (ml)	H ₂ SO ₄ (ml) t = min	Enzima (ml)	H ₂ SO ₄ 2N (ml) t = min.
1	1.5	8.0	3	0.5	-
2	1.5	8.0	-	0.5	3
3	1.5	7.5	3	1.0	-
4	1.5	7.5	-	1.0	3
5	1.5	6.5	3	2.0	-
6	1.5	6.5	-	2.0	3
7	1.5	5.5	3	3.0	-
8	1.5	5.5	-	3.0	3
9	1.5	4.5	3	4.0	-
10	1.5	4.5	-	4.0	3

- b. Proceda así: Numere las fiolas, añada H_2O_2 y H_2O .
- c. Si se trata de las fiolas 1, 3, 5, 7, 9, añádales el H_2SO_4 al tiempo cero antes de añadir la enzima.
- d. En el caso de la otras fiolas añada primero la enzima (no añada el ácido) y simultáneamente ponga a funcionar el cronómetro mezclando nuevamente.
- e. Espere el tiempo indicado (1 min) para añadir el ácido. Mezcle y titule con la solución de permanganato.
- f. Se hace una gráfica representativa del número de moles de H_2O_2 descompuestos por minutos en función del volumen de enzima empleado y en base a esa gráfica el grupo escogerá el volumen de enzima que empleará en las experiencias siguientes.

2.2.4. Determinación del tiempo de reacción:

- a. Realice la siguiente experiencia:

Fiola N°	H_2O_2 (ml)	H_2O (ml)	enzima (ml)	t(min)	H_2SO_4 2N(ml)
1	1.5	8.0	X	-	3
2	1.5	8.5-x	X	1	3
3	1.5	8.5-x	X	2	3
4	1.5	8.5-x	X	4	3
5	1.5	8.5-x	X	6	3

Nota: X es el volumen de enzima escogido en la experiencia anterior.

- b. El ácido sulfúrico se agrega después de transcurrido el tiempo prescrito a partir de la adición de la enzima excepto en fiola 1.
- c. Titule el H_2O_2 remanente en cada fiola y haga una gráfica que represente la cantidad de moles de H_2O_2 descompuestos en función del tiempo de incubación y en base a ella elija el tiempo de incubación que empleará en las experiencias sucesivas.

3. AUTO-EVALUACIÓN

1. ¿Qué papel (es) juega el ácido sulfúrico?
2. ¿Qué concluye respecto a los resultados de las fiolas 1, 3, 5, 7 y 9?
3. ¿Por qué puede suceder esto?.
4. La ecuación siguiente es en la que se basa el método de detección, efectúe el balance:

$$\text{MnO}_4^- + \text{H}_2\text{O}_2 + \text{H}^+ \Leftrightarrow \text{O}_2 + \text{Mn}^{++} + \text{H}_2\text{O}$$
5. Diseñar un protocolo que le permitan determinar los siguientes parámetros: a. Temperatura b. pH óptimo, c. Constante de Michaelis (K_m) y velocidad máxima (V_{\max}), d. Efecto de la azida de sodio sobre la actividad enzimática.
6. Calcule cómo se preparan 250 ml de una solución de H_2SO_4 2N a partir de una botella que tiene las siguientes especificaciones: $d=1.84$ g/ml y pureza 97%.

4. INFORME 6 (CATALASA)

Apellidos

Nombres

Grupo de prácticas

Nº del mesón

Fecha

Nº del estudiante

Calificaciones

Entrada		Desarrollo		Informe		Definitiva	
---------	--	------------	--	---------	--	------------	--

1. Diseñe una tabla en esta hoja para presentar sus resultados.

2. Anexe sus gráficas realizadas en papel milimetrado, recorte y pegue en el espacio a continuación.

3. Interprete sus resultados experimentales. Sea breve y ordenado

Nota: El informe debe ser entregado al finalizar la práctica, sin anexar hojas.